

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Mai 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/42484 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 19/04**,
C08B 37/06, A23L 1/0524, A61K 31/715

[DE/DE]; Kernerstrasse 8, 67550 Worms (DE). **MUNIR, Mohammad** [DE/DE]; Am Kinderbach 1, 67271 Kindenheim (DE). **VOGEL, Manfred** [DE/DE]; Am Höllpfad 1, 67271 Neuleiningen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13508

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. November 2001 (21.11.2001)

(74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, IL, JP, KR, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 57 976.0 22. November 2000 (22.11.2000) DE

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT MANNHEIM/OCHSENFURT** [DE/DE]; Maximilianstrasse 10, 68165 Mannheim (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KUNZ, Markwart**



WO 02/42484 A2

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PECTIN HYDROLYSIS PRODUCTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEKTINHYDROLYSEPRODUKTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing pectin hydrolysis products, pectin hydrolysis products which have been thus produced, and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyseprodukten, die so hergestellten Pektinhydrolyseprodukte sowie Verwendungen derselben.

-1-

Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyseprodukten

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolysaten, insbesondere eines pharmazeutischen oder diätetischen Präparats zur Verminderung und/oder Verhinderung der Adhäsion pathogener Substanzen und Organismen an eukaryontische Zellen, insbesondere Säugerzellen, oder zur Hemmung von Galectin 3-vermittelten Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die zur Entwicklung von Tumorerkrankungen führen, Verfahren zur Blockierung der Anlagerung pathogener Substanzen oder Organismen an eukaryontische Zellen, Verfahren zur Hemmung Galectin-3 vermittelter Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen, sowie die mittels dieser Verfahren hergestellten Pektinhydrolysate und Präparate.

Pathogene Organismen aber auch zellschädigende Substanzen müssen sich erst an der Oberfläche der Zielzelle anheften, um eine Infektion beziehungsweise Schädigung der angegriffenen Zelle hervorzurufen zu können. Diese Anheftung oder Adhäsion wird zum Beispiel durch eine Ligand-Rezeptor-Beziehung, wobei Glykostrukturen eine wichtige Rolle spielen, vermittelt. Werden diese Glykostrukturen auf der Zielzellen-Oberfläche oder am Liganden blockiert, kann eine Infektion verhindert werden.

Glykostrukturen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Tumorbildung und Metastasenbildung (Liotta et al., Annu. Rev. Cell Biol., 55 (1986), 1037-1057). Die Bildung von Tumoren umfasst zelluläre Interaktionen, die durch Zelloberflächenbestandteile, insbesondere Kohlenhydrat-bindende Proteine vermittelt werden. So wird die Adhäsion von Tumorzellen durch zelluläre Adhäsionsmoleküle vermittelt. Auch viele Stufen der Metastasenbildung umfassen Zell-Zell-Wechselwirkungen beziehungsweise Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM), die durch Zelloberflächenbestandteile vermittelt werden. Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht hauptsächlich aus Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen, von denen sehr viele glykosyliert sind und deren Oligosaccharid-Seitenketten Erkennungs-Determinanten für zelluläre Adhäsionsmoleküle bieten. Laminin ist ein N-verbundenes Glycoprotein, das Poly-N-Acetylactosamin-Sequenzen aufweist. Die Absiedelung von Metastasen erfolgt, wenn zirkulierende Agglomerate von Tumorzellen, Thrombozyten und Lymphozyten in Kapillaren über Adhäsionsmoleküle Kontakt zum Endothel aufnehmen. Diese Kontaktaufnahme liefert das Signal zur Öffnung der endothelialen Zell-Funktionen. Dadurch können die Tumorzellen über weitere Adhäsionsmoleküle an Rezeptoren auf der Basalmembran binden. Nach Zerstörung der Basalmembran erhalten die Tumorzellen direkten Zugang zum Stoma, wobei wiederum wie bei der primären Tumordinvasion Interaktionen zwischen Laminin und Fibronectin und den entsprechenden Rezeptoren erfolgen.

Wichtige Vertreter der Kohlenhydrat-bindenden Proteine sind die Galactosid-bindenden Lektine Galectin-1 und Galectin-3 (Raz und Lotan, Cancer Metastasis Rev. 6 (1987), 433; Gabius, Biochim. Biophys. Acta, 1071 (1991), 1). Von Galectin 3 ist bekannt, dass es die embolische Tumorversprengung im Blutkreislauf fördert und die Metastasenbildung erhöht. Galectin-3 wird auf der Zelloberfläche vieler Tumorzellen exprimiert, wobei sich die Galectin-3-Expression mit fortschreitender Tumorentwicklung erhöht. Galectin-3 wird ebenfalls von aktivierten Makrophagen und onkogen transformierten Zellen beziehungsweise Metastasenzellen exprimiert. Galectin-3 besitzt hohe Affinität zu Oligosacchariden, die Polylactosamine umfassen, wobei Galectin-3 insbesondere an zwei Glycoproteine bindet, die in mehreren Zelltypen, beispielsweise menschlichen Dickdarmkarzinom-Zellen und menschlichen Mammakarzinom-Zellen vorkommen. Ein anderer Ligand für Galectin 3 ist beispielsweise Laminin. Galectin 3, das auch auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, ist ebenfalls an der Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen beteiligt.

Die US 5,834,442 beschreibt Verfahren zur Behandlung von Krebserkrankungen in Säugetieren, insbesondere zur Behandlung von Prostatakarzinomen, wobei die Behandlung von Krebserkrankungen einschließlich der Hemmung von Metastasenbildung durch orale Verabreichung von modifiziertem Pektin, vorzugsweise wasserlöslichem pH-modifiziertem Citruspektin erfolgt. Zur Herstellung von pH-modifiziertem Pektin wird eine Pektinlösung durch Erhöhung des pH-Wertes auf 10,0 und danach Absenken

des pH-Wertes auf 3,0 depolymerisiert. Das modifizierte Pektin besitzt ein Molekulargewicht von etwa 1 bis 15 kd. Ratten, denen modifiziertes Citruspektin im Trinkwasser verabreicht wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen eine signifikant verringerte Bildung von Lungenmetastasen. In vitro-Experimenten zeigten, dass die Adhäsion von Galectin-3 exprimierenden MLL-Endothelzellen an Aorta-Endothelzellen der Ratte (RAEC) in Gegenwart von modifiziertem Citruspektin fast vollständig inhibiert wurde. In weiteren Experimenten wurde die Wirkung von pH-modifiziertem Citruspektin auf die Koloniebildung von MLL-Endothelzellen untersucht. Die Fähigkeit von Zellen zum Wachstum in halbfestem Medium (Anchorage-Unabhängigkeit) kann als Kriterium für die Zelltransformation und das Invasionspotential von Zellen verwendet werden, da das Zell-Wachstum in einem halbfesten Medium die Migration der Zellen und die Bildung von Kolonien erfordert. Dabei stellte sich heraus, dass modifiziertes Citruspektin sowohl die Anzahl der gebildeten MLL-Kolonien als auch deren Größe signifikant reduzieren konnte. Modifiziertes Citruspektin scheint dabei eher eine cytostatische Wirkung auszuüben als eine cytotoxische Wirkung. Auch die Wirkung von modifiziertem Citruspektin auf Zell-Zell-Wechselwirkungen und Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die auf Kohlenhydrat-vermittelten Mechanismen, insbesondere Galectin-3-vermittelten Interaktionen, beruhen, wurde untersucht. Dabei zeigt es sich, dass modifiziertes Citruspektin im Gegensatz zu nicht-modifiziertem Citruspektin die Adhäsion von B16-F1-Melanomzellen an Laminin inhi-

bierte. Von Laminin ist bekannt, dass es als Ligand für lösliches Galektin-3 dient.

Aus der EP 0 716 605 B1 ist bekannt, dass durch eine besonders hergestellte Karottensuppe, Blasentee, Kokosmilch etc., die Adhärenz pathogener Keime, wie etwa E. coli, an Zellen, insbesondere an Epithelzellen des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts wesentlich (das heißt bis zu 90 %) reduziert werden kann. Nach dieser Druckschrift ist diese Wirkung auf die in den Pflanzenprodukten vorhandenen Pektine zurückzuführen, bei denen es sich im Wesentlichen um Ketten von 1,4- α -glycosidisch verbundenen Galakturoniden handelt, deren Säuregruppen zu 20 bis 80 % mit Methanol verestert sind, und die neben Galakturonsäure gegebenenfalls noch andere Zuckerbausteine, zum Beispiel Glucose, Galactose, Xylose und Arabinose enthalten können. Aus der Druckschrift kann man weiter entnehmen, dass Monogalakturonsäure keine Blockierung der Adhäsion zeigt, während mit Digalakturonid und Trigalakturonid eine Blockierung zu 91,7 % beziehungsweise 84,6 % festzustellen ist. In dieser Druckschrift wird eindeutig festgestellt, dass die monomere Galakturonsäure keine Blockierung der Adhäsion aufweist und die erwünschte Blockierungswirkung mit zunehmendem Molekulargewicht der Galakturonide abnimmt. Daraus ergibt sich, dass der Polymerisationsgrad der erwünschten Galakturonide bei DP 2 beziehungsweise 3 liegt. Außerdem wird gefordert, dass der Veresterungsgrad <2% beträgt. Die nach der dort beschriebenen Methode hergestellten Pektinhydrolyseprodukte enthalten jedoch nur sehr niedrige Anteile an den als wirksam bezeichneten Di- und Trigalakturoniden

(ca. 12% bezogen auf den Rohstoff). Diese Herstell-
methode verschwendet Ressourcen und führt zu Um-
weltproblemen, da die in hohen Anteilen anfallenden
nicht brauchbaren Nebenprodukte entsorgt werden
5 müssen.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende
technische Problem besteht darin, weitere Verfahren
und Mittel zur Bekämpfung von Infektionen und zur
Verminderung und/oder Verhinderung der Adhäsion von
10 schädlichen, insbesondere pathogenen, Substanzen
und Organismen an eukaryontische Zellen, insbeson-
dere Säugerzellen, sowie zur Blockierung von Wech-
selwirkungen zwischen Säugerzellen, insbesondere
Tumorzellen, die durch auf der Zelloberfläche be-
15 findliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle
vermittelt werden und für die Entwicklung von ins-
besondere Tumorerkrankungen verantwortlich sind,
und zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbeson-
dere zur Verhinderung von Metastasenbildungen, bei
20 Säugern bereitzustellen.

Dieses technische Problem wird durch die erfin-
dungsgemäß vorgesehenen Verfahren zur Herstellung
von Pektinhydrolyseprodukten gelöst, die zur Her-
stellung von Oligogalakturoniden mit einem mög-
25 lichst geringen Anteil an Monomeren, einem hohen
Anteil von Molekülen mit jeweils zumindest einer
Doppelbindung sowie mit einem Veresterungsgrad von
≥20% führen und die mit einer wesentlich höheren
Ausbeute als im Stand der Technik beschrieben
30 durchgeführt werden können.

Das Problem wird insbesondere dadurch gelöst, dass man eine wässrige Lösung oder Suspension eines Pektins oder pektinhaltigen, insbesondere pflanzlichen, Materials, vorzugsweise eines Pektins mit einem hohen Veresterungsgrad, in einem ersten Verfahrensschritt mit einem ersten pektinhydrolysierenden Enzym A und dann in einem zweiten Verfahrensschritt mit einem zweiten pektinhydrolysierenden Enzym B behandelt. Man erhält ein vorstehend definiertes Pektinhydrolyseprodukt, welches hervorragende Eigenschaften als Mittel zur Verminderung oder Verhinderung der Adhäsion für die Lebens- und/oder Vermehrungsfunktionen von Zellen schädlicher, zum Beispiel pathogener, allergener, infektiöser oder toxischer, Substanzen oder Organismen, zum Beispiel Mikroorganismen wie Hefen, Pilze, Keime, Bakterien, Viren, Sporen, Viroide, Prionen aufweist.

Bei dem verwendeten Enzym A kann es sich zum Beispiel um eine Pektinlyase (EC 4.2.2.10) oder eine Endopolygalakturonase (EC 3.2.1.15), bevorzugt jedoch um eine Pektinlyase handeln. Bei dem verwendeten Enzym B kann es sich um eine Endopolygalakturonase oder eine Pektinlyase, bevorzugt jedoch um eine Endopolygalakturonase handeln.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass Galakturonide, die Doppelbindungen im Molekül tragen bei der Blockierung der Adhäsion von zum Beispiel pathogenen Keimen und zellschädigenden Substanzen an Epithelzellen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes besonders wirksam sind. Außerdem ist für eine besonders effiziente Verhinderung und/oder Verminderung, zum Beispiel Blockie-

5 rung, ein höherer Veresterungsgrad, insbesondere ≥ 20 , vorzugsweise ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , besonders bevorzugt ≥ 60 , ≥ 65 , ≥ 70 oder $\geq 71\%$ erforderlich. Die im Stand der Technik beschriebene Arbeitsweise führt jedoch nur zu Galakturoniden, die keine Doppelbin-

10 dungen aufweisen und praktisch vollständig entestert sind.

10 Unter dem Begriff Veresterungsgrad wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil der grundsätzlich für eine Veresterung zur Verfügung stehenden Säuregruppen eines Galakturonids verstanden, der mit einem Alkohol, insbesondere Methanol verestert ist.

15 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter ungesättigten Galakturonsäuremoleküle insbesondere 4,5-ungesättigte Galakturonsäuremoleküle verstanden.

20 In einer Ausführungsform der Erfindung ist es vorgesehen, nach der Behandlung mit dem Enzym B eine Behandlung mit einem weiteren, dritten Enzym C anzuschließen. Bei dem hierbei verwendeten Enzym C kann es sich um eine Pektinesterase (EC 3.1.1.11) handeln. Damit kann der Veresterungsgrad der Produkte besonders gezielt eingestellt werden.

25 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist es vorgesehen, dass nach erfolgter erfindungsgemäßer enzymatischer Behandlung die verbliebenen unlösten Bestandteile aus der Lösung durch Zentrifugation und/oder Ultrafiltration abgetrennt werden.

In einer weiteren Ausführungsform ist es vorgesehen, dass die nach erfolgter erfindungsgemäßer Enzymbehandlung und Klärung durch Zentrifugation beziehungsweise Ultrafiltration erhaltene Lösung
5 durch eine der an sich bekannten Methoden in trockene Form, zum Beispiel in gemahlene, körnige, granuliert oder Pulverform überführt wird.

Die nach der erfindungsgemäßen enzymatischen Behandlung erhaltene Lösung oder das daraus gewonnene
10 trockene Produkt zeigen sehr gute Wirkung im Hinblick auf die Blockierung der Adhäsion von zum Beispiel pathogenen Keimen und zellschädigenden Substanzen an zum Beispiel Epithelzellen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes bei Mensch und
15 Tier. Sie können deshalb zum Beispiel in Tierfutter zum Beispiel zur Verhinderung von Durchfallerkrankungen bei der Ferkelaufzucht eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzte Lösung oder Suspension des Pektins beziehungsweise des pektinhaltigen, vorzugsweise pflanzlichen, Materials weist einen pH-Wert in einem Bereich von 3,5 bis 5,5
20 oder/und in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Konzentration des Pektins von 3 % bis 25 % auf.

25 Die Behandlungen mit den Enzymen A, B und gegebenenfalls C finden bei einem pH-Wert von 3,5 bis 5,5 über eine Dauer von 2 Stunden bis 24 Stunden bei einer Temperatur von 25°C bis 60°C und einer Konzentration des Enzyms A, B gegebenenfalls C von 10
30 bis 30 ml/kg Pektin statt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Anteil der Galakturonide am Pektinhydrolysat (Gew.-% in Bezug auf Trockensubstanz) mindestens 60, ≥ 70 , ≥ 75 , ≥ 80 oder besonders
5 bevorzugt mindestens 85 Gew.-% beträgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass in dem Pektinhydrolysat der Anteil von Kohlenhydraten mit einem DP-1 (Monomere) an den Gesamtkohlenhydraten des Pektinhydrolysats < 25 ,
10 < 20 , < 10 , < 8 , < 5 , besonders bevorzugt < 4 Gew.-% (bezogen auf Trockensubstanz) ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Anteil der Kohlenhydrate, insbesondere Galakturonide mit einem Polymerisationsgrad DP > 10 bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt des Pektinhydrolysats weniger als 10, < 8 , besonders bevorzugt < 5 Gew.-% (bezogen auf Trockensubstanz) beträgt.
15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Anteil der ungesättigten Galakturonide am Gesamtgehalt der Galakturonide im Pektinhydrolysat mindestens 10, vorzugsweise > 15 , > 20 , > 25 , > 30 , insbesondere 36,5 Gew.-% bis 46 Gew.-% (bezogen auf Trockensubstanz) beträgt.
20

Die erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolysate weisen in bevorzugter Ausführung einen Anteil von mindestens 60, ≥ 70 , ≥ 75 , ≥ 80 oder besonders bevorzugt mindestens 85 % (auf Trockensubstanz) an Kohlenhydraten, insbesondere Galakturoniden mit einem
25 Polymerisationsgrad von 2 bis 10, bevorzugt von 3
30

bis 8, besonders bevorzugt 4,5 auf (Gew.-% Trockensubstanz, bezogen auf Gesamtkohlenhydratgehalt des Pektinhydrolysats).

Das eingesetzte Pektin ist in besonders bevorzugter Ausführungsform Citruspektin, Apfelpektin oder Zuckerrübenpektin.

Das eingesetzte pektinhaltige Material, insbesondere pflanzliche pektinhaltige Material, ist in bevorzugter Ausführungsform Apfeltrester, Zuckerrübenschnitzel oder Citrus-Pellets, also getrocknete Rückstände, zum Beispiel aus der Orangensaft-, Zitronensaft- und/oder Limonensaft-Herstellung.

Die erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolysate, also Pektinhydrolyseprodukte, eignen sich in hervorragender Weise als pharmazeutisches beziehungsweise diätetisches Präparat zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten oder/und zur Bekämpfung der Anlagerung von schädlichen Substanzen und/oder Organismen an Säugerzellen, insbesondere menschliche Zellen.

Die erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolysate eignen sich ebenfalls hervorragend als pharmazeutisches Präparat zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei einem Menschen oder einem Säugetier, insbesondere solchen Wechselwirkungen, die durch auf der Zelloberfläche befindliche Galectin 3-Moleküle vermittelt werden. Die erfindungsgemäßen Pektinhydrolyseprodukte sind daher insbesondere zur Hemmung von Zell-Zell-

und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen geeignet, an denen Tumorzellen beteiligt sind und die daher für die Entwicklung von Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen bei einem Menschen oder einem Säugetier verantwortlich sind. Die erfindungsgemäßen Pektinhydrolysate sind daher auch als pharmazeutisches Präparat zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Reduzierung des Tumorwachstums und/oder zur Reduzierung der Metastasenbildung bei Krebserkrankungen, geeignet, da sie die Galec-
5 tin-3-vermittelte Tumorzelladhäsion und/oder das Invasionspotential der Tumorzellen verhindern.
10

Die Erfindung betrifft daher auch die erfindungsgemäß erhaltenen Pektinhydrolysate, also Pektinhydro-
15 lyseprodukte, enthaltende pharmazeutische Präparate und diätetische Präparate, die beispielsweise als Lebensmittel oder Genussmittel ausgeführt sein können, zum Beispiel Milchprodukte, Joghurt, Cerealien, Backwaren etc..

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der vor-
20 genannten Pektinhydrolyseprodukte zur Herstellung von Arzneimitteln zur Verhinderung der Anlagerung oder Adhäsion von schädlichen Substanzen und/oder Organismen an Säugerzellen, insbesondere menschliche Zellen, insbesondere zur Bekämpfung, das heißt
25 Prophylaxe und Therapie, von Infektionskrankheiten, Vergiftungen, Allergien etc..

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der vor-
30 genannten Pektinhydrolyseprodukte zur Verhinderung der Anlagerung oder Adhäsion von schädlichen Substanzen und/oder Organismen an Säugerzellen, insbe-

sondere menschlichen Zellen, insbesondere zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten, Vergiftungen, Allergien etc..

Die erfindungsgemäß bekämpften Infektionen können insbesondere Infektionen des Blutsystems, der Atemwege, des Urogenitaltraktes, des Nasen-Rachenraumes oder des Gastrointestinaltraktes sein.

Ein weiteres Einsatzgebiet ist in der Humanernährung, wo sie zum Beispiel bei der Verhinderung von Durchfallerkrankungen bei Säuglingen aber auch Erwachsenen helfen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der vorgenannten Pektinhydrolyseprodukte zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, insbesondere solcher Wechselwirkungen, die durch auf der Zell-Oberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden und die für die Entwicklung humaner oder Säugetier-Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, verantwortlich sind. Bei diesen Erkrankungen handelt es sich insbesondere um Prostata-Karzinome, Nieren-Karzinome, Kaposi-Sarkom, Verlaufsformen der chronischen Leukämie, Mammakarzinome, Mamma-Adenokarzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Rektumkarzinome, Rachenkarzinome, Melanome, Dünndarm-Tumore, Dickdarm-Karzinome, Blasentumore, Mastozytome, Lungenkarzinome, Bronchialkarzinome, Rachen-Plattenepithelkarzinome, Gastrointestinalkarzinome und Magenkarzinome. Die erfindungsgemäßen Pektinhydrolyseprodukte können insbesondere zur Reduzie-

5 rung des Invasionspotentials metastasierender Tumorzellen und/oder zur Hemmung der Adhäsion von Tumorzellen verwendet werden. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolyseprodukte oral verabreicht.

10 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Pektinhydrolyseprodukte zur Behandlung von Tumorerkrankungen eines Menschen oder eines Säugetiers.

15 Die erfindungsgemäßen Pektinhydrolysate lassen sich vorzugsweise zur Behandlung solcher Tumore einsetzen, die auf Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix beruhen, insbesondere solchen Wechselwirkungen, die durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin-3-Moleküle vermittelt werden. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Pektinhydrolysate können daher vorzugsweise

20 Prostata-Karzinome, Nieren-Karzinome, Kaposi-Sarkom, Verlaufsformen der chronischen Leukämie, Mammakarzinome, Mamma-Adenokarzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Rektumkarzinome, Rachenkarzinome, Melanome, Dünndarm-Tumore, Dickdarm-Karzinome, Blasen-tumore, Mastrozytome, Lungenkarzinome, Bronchialkarzinome, Rachen-Plattenepithelkarzinome, Gastrointestinalkarzinome und Magenkarzinome behandelt werden. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Pektinhydrolysate zur Tumorbildung zielt insbesondere auf die Hemmung der Adhäsion von Tumorzellen

30 und/oder die Verminderung des Invasionspotentials metastasierender Tumorzellen ab.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung der vorgenannten Pektinhydrolyseprodukte zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, insbesondere solcher Wechselwirkungen, die durch auf der Zell-Oberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden und die für die Entwicklung humaner oder Säugetier-Erkrankungen, insbesondere der vorstehend beschriebenen Tumorerkrankungen, verantwortlich sind. Das pharmazeutische Präparat zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix wird vorzugsweise oral verabreicht.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft daher auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Pektinhydrolyseprodukte zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates, das zur Behandlung der vorstehend beschriebenen Tumorerkrankungen verwendet werden kann, also zur Behandlung von Tumoren, die auf Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix beruhen, insbesondere solcher Wechselwirkungen, die durch auf der Zell-Oberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass das pharmazeutische Präparat zur Reduzierung des Tumorwachstums und/oder zur Reduzierung der Metastasenbildung eingesetzt werden kann, wobei das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat insbesondere die Adhäsion von Tumorzellen verhindert und/oder das Invasionspotential von Tu-

morzellen reduziert. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat oral verabreicht.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein
5 Verfahren zur Blockierung der Anlagerung von schädlichen, insbesondere pathogenen Substanzen oder Organismen an Zellen eines menschlichen oder Säugetierkörpers, umfassend die Verabreichung der erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolyseprodukte an
10 einen Menschen oder ein Säugetier in einer Menge, die ausreicht, die Anlagerung der schädlichen Substanzen oder Organismen an Säugerzellen zu blockieren und die Entstehung einer Infektion zu verhindern. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäß her-
15 gestellten Pektinhydrolyseprodukte oral verabreicht.

Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, die durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin-3-Moleküle vermittelt werden und für die Entwicklung humaner oder Säugetier-Erkrankungen, insbesondere die vorstehend genannten Tumorerkrankungen verantwort-
20 wortlich sind, umfassend die Verabreichung der erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolyseprodukte an einen Menschen oder ein Säugetier mit einer Tumorerkrankung in einer Menge, die ausreicht, Galectin-3-vermittelte Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-
25 Wechselwirkungen zu reduzieren und/oder zu hemmen. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäß hergestellten Pektinhydrolyseprodukte oral verabreicht.
30

Die vorliegende Erfindung betrifft auch pharmazeu-
tische Präparate, die die erfindungsgemäßen Pektin-
hydrolyseprodukte in pharmazeutisch oder therapeu-
tisch wirksamen Mengen enthalten. Im Zusammenhang
5 mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem
„pharmazeutischen Präparat“ ein zu diagnostischen,
therapeutischen und/oder prophylaktischen Zwecken
verwendetes Gemisch verstanden, das die erfindungs-
gemäßen Pektinhydrolyseprodukte als Wirkstoffe in
10 einer bei einem Patienten oder einem Säugetier gut
applizierbaren Form enthält. Das pharmazeutische
Präparat kann sowohl ein festes als auch ein flüs-
siges Gemisch sein. „In pharmazeutisch oder thera-
peutisch wirksamen Mengen“ bedeutet, dass die in
15 dem pharmazeutischen Präparat enthaltenen Wirkstof-
fe in einer Dosis enthalten sind, die ausreicht,
den Ausbruch einer Erkrankung, beispielsweise einer
Infektionskrankheit oder einer Tumorerkrankung zu
verhindern, den Zustand einer derartigen Erkrankung
20 zu heilen, die Progression einer solchen Erkrankung
zu stoppen und/oder die Symptome einer solchen Er-
krankung zu lindern. Die erfindungsgemäßen pharma-
zeutischen Präparate weisen zusätzlich zu den er-
findungsgemäßen Pektinhydrolyseprodukten in bevor-
25 zugter Ausführungsform pharmazeutische verträgliche
Träger sowie gegebenenfalls Verdünnungsmittel,
Trennmittel, Gleitmittel, Hilfsstoffe, Füllstoffe,
Süßstoffe, Aromastoffe, Farbstoffe, Geschmacksstof-
fe oder andere pharmazeutisch wirksame Substanzen
30 auf.

In den erfindungsgemäß vorgesehenen diätetischen
Präparaten werden die Pektinhydrolyseprodukte eben-

falls in einer pharmazeutisch wirksamen Menge eingesetzt.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen aufgeführt.

- 5 Die Erfindung wird mit Hilfe der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1:

10 Zu 1 l einer Citruspektinlösung (30 g hochverestertes Pektin in 1 l Wasser) wurde 0,3 ml einer Pektinlyase (zum Beispiel Rohapect PTE von Röhm) zugegeben und die Lösung unter Rühren bei pH 5,0 und 45°C für 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 0,75 ml einer Endopolygalakturonase (zum Beispiel Pectinase PL von Amano) hinzugefügt und bei unveränderten Reaktionsbedingungen für weitere 3 Stunden inkubiert. Dann wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 95°C inaktiviert. Der unlösliche Rückstand wurde durch Zentrifugation entfernt, die klare Lösung zur Trockne eingedampft und der erhaltene Feststoff gewogen. Die Auswaage betrug 25,8 g (entsprechend einer Ausbeute von 75,6 % bezogen auf den eingesetzten Rohstoff).

25 Das erhaltene Produkt wurde nach allgemein bekannten Analysemethoden untersucht und dafür folgende Zusammensetzung festgestellt:

- 19 -

	Kohlenhydrate	DP 1	3,6 %
	Galakturonide		83,9 %
	davon ungesättigte	46,0 %	
	(angenommener mittl. DP= 4,5)		
5	DP 2 - 10	80,4 %	
	DP > 10	16,0 %	
	Veresterungsgrad	72,0 %	
	Salzgehalt		3,0 %
	Rohprotein		1,7 %
10	Wassergehalt		4,6 %

Beispiel 2:

Zu 1 l einer Citruspektinlösung (30 g hochverester-
 tes Pektin in 1 l Wasser) wurde 0,3 ml einer Pek-
 tinlyase (zum Beispiel Rohapect PTE von Röhm) zuge-
 15 geben und die Lösung unter Rühren bei pH 5,0 und
 45°C für 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 0,75 ml
 einer Endopolygalakturonase (zum Beispiel Pectinase
 PL von Amano) hinzugefügt und bei unveränderten Re-
 aktionsbedingungen für weitere 3 Stunden inkubiert.
 20 Dann wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 95°C in-
 aktiviert.

Der unlösliche Rückstand wurde durch Zentrifugation
 entfernt und die klare Lösung wurde ultrafiltriert
 (cut-off 10.000). Das Permeat wurde getrocknet und
 25 ergab 22,8 g Feststoff (Ausbeute 66,8 % bezogen auf
 den eingesetzten Rohstoff).

	Kohlenhydrate	DP 1	3,0 %
	Galakturonide		84,1 %
	davon ungesättigte	36,5 %	
	(angenommener mittl. DP = 4,5)		
5	DP 2 - 10	93,0 %	
	DP > 10	4,0 %	
	Veresterungsgrad	72,0 %	
	Salzgehalt		6,7 %
	Rohprotein		1,3 %
10	Wassergehalt		4,4 %

Beispiel 3

Zu 1 l einer Citruspektinlösung (30 g hochverester-
 tes Pektin in 1 l Wasser) wurde 0,3 ml einer Pek-
 tinlyase (zum Beispiel Rohapect PTE von Röhm) zuge-
 15 geben und die Lösung unter Rühren bei pH 5,0 und
 45°C für 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 0,75 ml
 einer Endopolygalakturonase (zum Beispiel Pectinase
 PL von Amano) hinzugefügt und bei unveränderten Re-
 aktionsbedingungen für weitere 3 Stunden inkubiert.
 20 Danach wurden 0,5 ml einer Pektinesterase (zum Bei-
 spiel Rheozyme von Novo Nordisk) hinzugefügt und
 für weitere 45 Minuten inkubiert. Dann wurden die
 Enzyme durch Erhitzung auf 95°C inaktiviert. Der
 unlösliche Rückstand wurde durch Zentrifugation
 25 entfernt, die klare Lösung zur Trockne eingedampft.

Das erhaltene Produkt wurde nach allgemein bekann-
 ten Analysemethoden untersucht. Es wurde abweichend
 vom Beispiel 1 ein Veresterungsgrad von 35 % fest-
 gestellt.

Beispiel 4:

Getrocknete Orangenschalen oder Citrus-Pellets wurden auf eine Partikelgröße von ca. 1-5 mm zerkleinert und davon 100 g in 400 ml Wasser eingerührt und aufquellen gelassen. Dann wurde konzentrierte Salpetersäure (10 g) hinzugefügt und die Suspension auf 85°C erwärmt und bei dieser Temperatur für 1,5 Stunden gerührt. Dann wurde auf 45°C abgekühlt, der pH-Wert mit NaOH auf 4,5 angehoben und nach Zugabe von 0,3 ml einer Pektinlyase (zum Beispiel Rohapect PTE von Röhm) für 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 0,75 ml einer Endopolygalakturonase (zum Beispiel Pectinase PL von Amano) hinzugefügt und bei unveränderten Reaktionsbedingungen für weitere 3 Stunden inkubiert. Dann wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 95°C inaktiviert, aufkonzentriert und die Suspension an einem Walzentrockner getrocknet.

Beispiel 5:

Getrocknete Orangenschalen oder Citrus-Pellets wurden auf eine Partikelgröße von ca. 1-5 mm zerkleinert und davon 100 g in 400 ml Wasser eingerührt und aufquellen gelassen. Dann wurde konzentrierte HCl (8 g) hinzugefügt und die Suspension auf 85°C erwärmt und bei dieser Temperatur für 1,5 Stunden gerührt. Dann wurde auf 45°C abgekühlt, der pH-Wert mit NaOH auf 4,5 angehoben und nach Zugabe von 0,3 ml einer Pektinlyase (zum Beispiel Rohapect PTE von Röhm) für 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 0,75 ml einer Endopolygalakturonase (zum Beispiel Pectinase PL von Amano) hinzugefügt und bei unveränderten Reaktionsbedingungen für weitere 3 Stunden inkubiert.

Dann wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 95°C inaktiviert, aufkonzentriert und die Suspension an einem Walzentrockner getrocknet.

Beispiel 6:

- 5 Verhinderung der Adhäsion von pathogenen Keimen in humanen Epithelzellen

Für diesen Test wurden menschliche Uroepithelzellen, gewonnen durch Zentrifugation aus dem Morgenharn sowie je zwei Stämme von Staphylococcus aureus
10 und E. coli, jeweils als Suspension mit 10^9 Keimen/mL eingesetzt.

Testdurchführung

Epithelzellen und Keimsuspension wurden zusammen bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Dann wurden die
15 Epithelzellen von den nicht adhärenen Keimen durch Membranfiltration (8µ) abgetrennt. Die Filter wurden mehrfach gewaschen, in physiologische Kochsalzlösung eingebracht und die Epithelzellen darin suspendiert. Nach Zentrifugation der Suspension in
20 Kochsalzlösung wurde das Pellet auf Objektträger aufgetragen, und nach May-Grünwald und Giemsa gefärbt. Die Anzahl der an 50 Epithelzellen anhaftenden Keime wurde gezählt. Die Zahl ergab den Leerwert. Als Kontrolle dienten Epithelzellen ohne Zu-
25 gabe einer Keimsuspension.

In dem Hauptversuch wurden Epithelzellen zunächst mit unterschiedlich konzentrierten wässrigen Lösungen aus erfindungsgemäß hergestellten (entsprechend Beispiel 1) Pektinhydrolyseprodukten für 1, 2 be-

ziehungsweise 3 Stunden inkubiert. Dann wurden sie mit der Keimsuspension zusammengebracht und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die Zählung der anhaftenden Keime an 50 Epithelzellen ergab den
5 Messwert.

Ergebnis

Bei den als Vergleich eingesetzten "neutralen" Kohlenhydraten wie zum Beispiel Raffinose, Nystose und Isomelezitose wurde keine Verminderung der Keiman-
10 lagerung an den Epithelzellen festgestellt. Mit den erfindungsgemäßen Pektinhydrolyseprodukten wurde die Adhäsion aller geprüfter Mikroorganismen fast vollständig (Blockierung: >95%) verhindert.

Beispiel 7:

15 1,5 g des in Beispiel 2 gewonnenen getrockneten Permeates wurden in 100 ml 50 mM Na-Acetat-Lösung, pH-Wert 5,0, gelöst und anschließend über eine Säule (2,6 x 30 cm), die mit dem Anionenaustauscher AG 1 X2 (Fa. Biokad) gefüllt und mit 50 mM Na-
20 Acetat-Lösung, pH-Wert 5,0, äquilibriert worden war, gegeben. Der Vorlauf aus der Säule wurde mittels HPAEC (Highperformance anion exchange chromatography) analysiert sowie mittels 1 N HCl bei 95°C für eine Stunde hydrolysiert.

25 Ergebnis:

Im Vergleich mit Raftiline (Fa. Orafti) als Standard wiesen die von der Säule eluierten Oligosaccharide eine DP-Verteilung von 2 - 12 auf.

Die Analyse der Hydrolysate mittels eines Zuckeranalysators (Fa. Biotronik) ergab an Monosacchariden vornehmlich Galactose (70 %), daneben Arabinose (23 %) sowie Spuren an Glucose und Mannose. Insgesamt wurden 8,3 % der Galacturonide-haltigen Produkte als neutralzuckerhaltige Oligosaccharide im Vorlauf erhalten.

Beispiel 8:

10 Wachstum von Colonkarzinom-Zelllinien auf extrazellulärer Matrix (ECM) in Gegenwart von Pektinhydrolysat

Die humanen Colonkarzinom-Zelllinien HT-29 beziehungsweise Caco-2 wurden in einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml auf 15 mm-Petrischalen ausgesät und im Medium RPMI 1640 + 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (HT-29) beziehungsweise MEM + 10 % FCS (Caco-2) bei 37°C unter einer 5 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden 1 bis 2 Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend wurden die Schalen einmal mit PBS gewaschen, dann mit PBS und 0,5 % Triton X-100 30 min bei Raumtemperatur auf einer Schüttelvorrichtung inkubiert und danach 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die vorstehend beschriebenen Zelllinien wiederum auf den Schalen mit den so präparierten ECM-Schichten ausgesät. Der Einfluss von Pektinhydrolysat auf das Zellwachstum wurde durch Messung der Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach 48 Stunden mittels Trypsin/EDTA-Lösung in HBSS wieder abgelöst (10 min) und in PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Anzahl lebender Zellen durch

- 25 -

Färben mit Tryphanblau-Lösung (650 mg Tryphanblau in 400 ml 0,9 % NaCl, 1:1 (v/v)) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Kontrolle wurden Experimente mit Glucose durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass Glucose keinen Einfluss auf das Wachstum der Zelllinien HT 29 und Caco-2 ausübte, während Pektinhydrolysat das Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration um bis zu 75% reduzierte.

Tabelle 1

	Reduktion des Zell-Wachstums			
	HT 29		Caco-2	
Konzentration	Pektinhydrolysat	Glucose	Pektinhydrolysat	Glucose
0,01 %	30 %	0 %	25 %	0 %
0,1 %	45 %	1 %	43 %	0 %
1,0 %	75 %	0 %	70 %	0 %

Beispiel 9:Verminderung der Invasionskapazität von Caco-2-Zellen durch Pektinhydrolysat

- Die Wirkung von Pektinhydrolysat auf die Invasionskapazität von Caco-2-Zellen wurde unter Verwendung des von Erkell und Schirmacher beschriebenen Invasionstests (Cancer Research, 48 (1988), 6933-6937) untersucht. Der Test basiert auf der Wanderung von Zellen durch die Poren eines Nucleopore Polycarbonat-Filters in ein Proteingel, das verschiedene ECM-Proteine wie beispielsweise Collagen Typ I und III, Fibronectin und Laminin enthält, auf ein Nitrocellulosefilter. Die Zellen wurden gemeinsam mit dem Pektinhydrolysat in das Testsystem gegeben und anschließend wurden die durch die Proteinschicht gewanderten Zellen in der unteren Nitrocellulose-schicht quantitativ ausgewertet. Zur Kontrolle wurde die Wirkung von Glucose auf die Invasionskapazität von Caco-2-Zellen untersucht.
- Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass das erfindungsgemäße Pektinhydrolysat die Invasionskapazität von Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration teilweise erheblich reduzieren konnte, während Glucose lediglich in höheren Konzentrationen eine geringfügige Verminderung der Invasionskapazität von Caco-2-Zellen bewirkte.

Tabelle 2

	Verminderung der Invasionskapazität von Caco-2-Zellen	
Konzentration	Pektinhydrolysat	Glucose
0,01 %	30 %	0 %
0,1 %	69 %	2 %
1,0 %	88 %	3 %

Beispiel 10:

5 Anti-Galectin-3-Antikörperbindung durch Pektin-
hydrolysat

Die Expression von Galectin-3 auf Colon-Karzinomzellen wurde unter Verwendung eines anti-Galectin-3-spezifischen monoclonalen Antikörpers
 10 (Maus-Ig) und eines entsprechenden anti-Maus-FITC-gekoppelten sekundären Antikörpers mittels Immunfluoreszenz/Durchflusscytometrie-Verfahren be-
 stimmt. Steigende Konzentrationen des Pektinhydro-
 15 lysates und von Glucose als Kontrolle wurden ge-
 meinsam mit dem primären Antikörper auf den Ziel-
 zellen inkubiert und anschließend wurde der inhi-
 bierende Einfluss der löslichen Zuckersubstanz auf
 die anti-Galectin-3-Bindung gemessen.

Der Einfluss von Pektinhydrolysat auf die anti-Galectin-3-Bindung ist in Tabelle 3 gezeigt. Aus Tabelle 3 geht hervor, dass Glucose die Bindungsreaktion des monoclonalen anti-Galectin-3-Antikörpers nicht oder lediglich geringfügig reduziert, während Pektinhydrolysat die Bindung des Antikörpers in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration teilweise erheblich reduziert.

Tabelle 3

	Reduktion der Bindung des monoclonalen anti-Galectin-3 Antikörpers in %			
	HT-29		Caco-2	
Konzentration	Pektinhydrolysat	Glucose	Pektinhydrolysat	Glucose
0,01 %	34	0	28	0
0,1 %	67	0	63	0
1 %	85	2	82	0

5 **Ansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyse-
produkten, wobei ein Pektin oder pektinhaltiges
pflanzliches Material in wässriger Lösung oder Sus-
pension in einem ersten Verfahrensschritt mit einem
10 pektinhydrolysierenden Enzym A und in einem zweiten
Verfahrensschritt mit einem pektinhydrolysierenden
Enzym B behandelt wird, wobei Pektinhydrolysepro-
dukte erhalten werden mit einem Anteil an Galaktu-
roniden, die zumindest ein 4,5-ungesättigtes Galak-
15 turonsäuremolekül enthalten und mit Methanol zu
≥20% verestert sind.

2. Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyse-
produkten nach Anspruch 1, wobei die aus dem zwei-
ten Verfahrensschritt erhaltenen flüssigen Hydroly-
20 seprodukte in einem dritten Verfahrensschritt mit
einem Enzym C behandelt werden.

3. Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyse-
produkten nach Anspruch 1 oder 2, wobei die aus dem
zweiten oder dritten Verfahrensschritt erhaltenen
25 flüssigen Hydrolyseprodukte durch Filtration
und/oder Zentrifugation von unlöslichen Bestandtei-
len befreit und in trockene Form überführt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **da-
durch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem einge-

setzten Pektin um Citruspektin, Apfelpektin oder Zuckerrübenpektin handelt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem pektinhaltigen Material um Zuckerrübenschnitzel, Apfeltrester oder getrocknete Rückstände aus der Orangensaft-, Zitronensaft- und/oder Limonensaft-Herstellung handelt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Enzym A um eine Endopolygalakturonase oder eine Pektinlyase (EC 4.2.2.10) handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Enzym B um eine Endopolygalakturonase (EC 3.2.1.15) oder eine Pektinlyase handelt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Enzym C um eine Pektinesterase (EC 3.1.1.11) handelt.
9. Pektinhydrolyseprodukte, herstellbar nach einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Pharmazeutisches oder diätetisches Präparat, enthaltend ein Pektinhydrolyseprodukt nach Anspruch 9 gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.
11. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Herstellung eines pharma-

zeutischen Präparates zur Blockierung der Anlagerung von schädlichen Substanzen oder Organismen an Säugerzellen, insbesondere zur Infektionsbekämpfung.

- 5 12. Verwendung eines Pektinhydrolyseproduktes hergestellt nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Blockierung der Anlagerung von schädlichen Substanzen oder Organismen an Säugerzellen, insbesondere zur Infektionsbekämpfung.
- 10 13. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 als Bestandteil von für die menschliche Ernährung bestimmter Nahrungsmitteln.
- 15 14. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 als Tierfutterbestandteil.
- 20 15. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei einem Menschen oder einem Säugetier.
- 25 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden.
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei die Zellen Tumorzellen sind und die Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen für die Entwicklung

von humanen oder Säugetier-Tumorerkrankungen verantwortlich sind.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die Tumorerkrankungen Prostata-Karzinome, Nieren-Karzinome, Kaposi-Sarkome, Verlaufsformen von chronischer Leukämie, Mammakarzinome, Mamma-Adenokarzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Rektumkarzinome, Rachenkarzinome, Melanome, Dünndarmtumore, Dickdarmkarzinome, Blasentumore, Mastozytome, Lungenkarzinome, Bronchialkarzinome, Rachen-Plattenepithelkarzinome, Gastrointestinalkarzinome und/oder Magentumore sind.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei die Pektinhydrolysate die Adhäsion von Tumorzellen hemmen und/oder das Invasionspotential metastasierender Tumorzellen reduzieren.
20. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Behandlung von Tumorerkrankungen eines Menschen oder eines Säugetiers.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Tumorerkrankungen auf Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix basieren.
22. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei die Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden:

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei die Tumorerkrankungen Prostata-Karzinome, Nieren-Karzinome, Kaposi-Sarkome, Verlaufsformen von chronischer Leukämie, Mammakarzinome, Mamma-
5 Adenokarzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Rektumkarzinome, Rachenkarzinome, Melanome, Dünndarmtumore, Dickdarmkarzinome, Blasentumore, Mastrozytome, Lungenkarzinome, Bronchialkarzinome, Rachen-
10 Plattenepithelkarzinome, Gastrointestinalkarzinome und/oder Magentumore sind.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 23, wobei die Pektinhydrolysate die Adhäsion von Tumorzellen hemmen und/oder das Invasionspotential metastasierender Tumorzellen reduzieren.

15 25. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Hemmung von Zell-Zell-
Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen
20 Zellen und der extrazellulären Matrix bei einem Menschen oder einem Säugetier.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-
25 bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden.

27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26, wobei die Zellen Tumorzellen sind und die Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen für die Entwicklung von humanen oder Säugetier-Tumorerkrankungen ver-
30 antwortlich sind.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 27, wobei die Tumorerkrankungen Prostata-Karzinome, Nieren-Karzinome, Kaposi-Sarkome, Verlaufsformen von chronischer Leukämie, Mammakarzinome, Mamma-
5 Adenokarzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Rektumkarzinome, Rachenkarzinome, Melanome, Dünndarmtumore, Dickdarmkarzinome, Blasentumore, Mastrozytome, Lungenkarzinome, Bronchialkarzinome, Rachen-
Plattenepithelkarzinome, Gastrointestinalkarzinome
10 und/oder Magentumore sind.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 28, wobei die Pektinhydrolysate die Adhäsion von Tumorzellen hemmen und/oder das Invasionspotential metastasierender Tumorzellen reduzieren.
- 15 30. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 29, wobei das pharmazeutische Präparat oral verabreicht wird.
- 20 31. Verwendung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung von Tumorerkrankungen eines Menschen oder eines Säugetiers.
- 25 32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei die Tumorerkrankungen auf Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix basieren.
- 30 33. Verwendung nach Anspruch 31 oder 32, wobei die Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden.

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei die Tumorerkrankungen Prostata-Karzinome, Nieren-Karzinome, Kaposi-Sarkome, Verlaufsformen von chronischer Leukämie, Mammarkarzinome, Mamma-
5 Adenokarzinome, Sarkome, Ovarialkarzinome, Rektumkarzinome, Rachenkarzinome, Melanome, Dünndarmtumore, Dickdarmkarzinome, Blasentumore, Mastozytome, Lungenkarzinome, Bronchialkarzinome, Rachen-Plattenepithelkarzinome, Gastrointestinalkarzinome
10 und/oder Magentumore sind.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 34, wobei das pharmazeutische Präparat zur Reduzierung des Tumorwachstums, insbesondere zur Hemmung der Adhäsion von Tumorzellen eingesetzt wird.

15 36. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 35, wobei das pharmazeutische Präparat zur Reduzierung der Metastasenbildung, insbesondere zur Reduzierung des Invasionspotentials von Tumorzellen eingesetzt wird.

20 37. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 36, wobei das pharmazeutische Präparat oral verabreicht wird.

38. Verfahren zur Blockierung der Anlagerung von schädlichen Substanzen oder Organismen an Zellen
25 eines menschlichen oder Säugetierkörpers, umfassend die Verabreichung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 8 an einen Menschen oder ein Säugetier in einer Menge, die ausreicht, die Anlagerung von schädlichen Substanzen oder Organismen an Säugerzellen zu blockieren
30

und insbesondere die Entwicklung einer Infektionskrankheit zu verhindern.

39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die Pektinhydrolyseprodukte oral verabreicht werden.

5 40. Verfahren zur Hemmung von Zell-Zell-Wechselwirkungen und/oder von Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, die durch auf der Zelloberfläche befindliche Kohlenhydrat-bindende Galectin 3-Moleküle vermittelt werden
10 und für die Entwicklung humaner oder Säugetier-Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, verantwortlich sind, umfassend die Verabreichung der Pektinhydrolyseprodukte hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 8 an einen Menschen oder ein Säugetier
15 tier mit einer Tumorerkrankung in einer Menge, die ausreicht, die Galectin 3-vermittelten Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen zu reduzieren und/oder zu hemmen.

20 41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die Pektinhydrolyseprodukte oral verabreicht werden.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Mai 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/042484 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 19/04**,
C08B 37/06, A23L 1/0524, A61K 31/715, C08B 37/00

Mohammad [DE/DE]; Am Kinderbach 1, 67271 Kindenheim (DE). **VOGEL, Manfred** [DE/DE]; Am Höllpfad 1, 67271 Neuleiningen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13508

(74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. November 2001 (21.11.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, IL, JP, KR, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 57 976.0 22. November 2000 (22.11.2000) DE

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT MANNHEIM/OCHSENFURT** [DE/DE]; Maximilianstrasse 10, 68165 Mannheim (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 16. Oktober 2003

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KUNZ, Markwart** [DE/DE]; Kernerstrasse 8, 67550 Worms (DE). **MUNIR,**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/042484 A3

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PECTIN HYDROLYSIS PRODUCTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEKTINHYDROLYSEPRODUKTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing pectin hydrolysis products, pectin hydrolysis products which have been thus produced, and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyseprodukten, die so hergestellten Pektinhydrolyseprodukte sowie Verwendungen derselben.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationa l application No
PCT/EP 01/13508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P19/04 C08B37/06 A23L1/0524 A61K31/715 C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C08B A61K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 716 605 B (LAEVOSAN GMBH & CO KG) 19 June 1996 (1996-06-19) cited in the application page 2, line 1 -page 3, line 37; examples ---	1-41
A	DE 42 23 613 A (ZUCKERINDUSTRIE VEREIN) 20 January 1994 (1994-01-20) the whole document --- -/--	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2003

Date of mailing of the international search report

14/02/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Interna — Application No
 PCT/EP 01/13508

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ENDRESS H-U ET AL: "MONITORING THE COURSE OF ENZYMIC DEGRADATION OF PECTIC SUBSTANCES BY AUTOMATED FAST ION CHROMATOGRAPHY FIC" LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 24, no. 1, 1991, pages 80-85, XP009003140 ISSN: 0023-6438 page 81, left-hand column, paragraph 1; figures 4,5; table 1 page 82, left-hand column, line 1 -page 83, left-hand column, line 3	1-8
X	page 83, left-hand column, line 1 - line 3; figures 4,5	9
X	----- KESTER H C ET AL: "Performance of selected microbial pectinases on synthetic monomethyl-esterified di- and trigalacturonates." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 24 DEC 1999, vol. 274, no. 52, 24 December 1999 (1999-12-24), pages 37053-37059, XP002225691 ISSN: 0021-9258	9
A	the whole document	1-8
A	----- US 5 834 442 A (RAZ AVRAHAM ET AL) 10 November 1998 (1998-11-10) cited in the application the whole document -----	12,15-41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
EP01/13508

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**see supplementary sheet (FURTHER INFORMATION
CONTINUED FROM PCT/ISA/210)**

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

Continuation of I.1

Although Claims 12, 15-24 and 38-41 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of I.1

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna Application No

PCT/EP 01/13508

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0716605	B	19-06-1996	DE 4330773 A1	16-03-1995
			AT 174222 T	15-12-1998
			AU 679262 B2	26-06-1997
			AU 7695694 A	27-03-1995
			CA 2171197 A1	16-03-1995
			CZ 9600708 A3	16-10-1996
			DE 59407457 D1	21-01-1999
			DK 716605 T3	16-08-1999
			WO 9507084 A1	16-03-1995
			EP 0716605 A1	19-06-1996
			ES 2127940 T3	01-05-1999
			GR 3029619 T3	30-06-1999
			HU 74431 A2	30-12-1996
			JP 9502195 T	04-03-1997
			PL 313393 A1	24-06-1996
			SK 32996 A3	05-03-1997
			US 5683991 A	04-11-1997
DE 4223613	A	20-01-1994	DE 4223613 A1	20-01-1994
US 5834442	A	10-11-1998	AU 695677 B2	20-08-1998
			AU 2944295 A	09-02-1996
			BR 9508245 A	30-09-1997
			CA 2194586 A1	25-01-1996
			CN 1157567 A	20-08-1997
			EP 0768885 A1	23-04-1997
			FI 965269 A	07-03-1997
			JP 11503715 T	30-03-1999
			NO 970039 A	17-02-1997
			WO 9601640 A1	25-01-1996
			US 5895784 A	20-04-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen
PCT/EP 01/13508

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12P19/04 C08B37/06 A23L1/0524 A61K31/715 C08B37/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C08B A61K A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 716 605 B (LAEVOSAN GMBH & CO KG) 19. Juni 1996 (1996-06-19) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 1 -Seite 3, Zeile 37; Beispiele	1-41
A	DE 42 23 613 A (ZUCKERINDUSTRIE VEREIN) 20. Januar 1994 (1994-01-20) das ganze Dokument	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/02/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Döpfer, K-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne Aktenzeichen
PCT/EP 01/13508

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ENDRESS H-U ET AL: "MONITORING THE COURSE OF ENZYMIC DEGRADATION OF PECTIC SUBSTANCES BY AUTOMATED FAST ION CHROMATOGRAPHY FIC" LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, Bd. 24, Nr. 1, 1991, Seiten 80-85, XP009003140 ISSN: 0023-6438 Seite 81, linke Spalte, Absatz 1; Abbildungen 4,5; Tabelle 1 Seite 82, linke Spalte, Zeile 1 -Seite 83, linke Spalte, Zeile 3	1-8
X	Seite 83, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 3; Abbildungen 4,5	9
X	----- KESTER H C ET AL: "Performance of selected microbial pectinases on synthetic monomethyl-esterified di- and trigalacturonates." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 24 DEC 1999, Bd. 274, Nr. 52, 24. Dezember 1999 (1999-12-24), Seiten 37053-37059, XP002225691 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	9
A	-----	1-8
A	US 5 834 442 A (RAZ AVRAHAM ET AL) 10. November 1998 (1998-11-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	12,15-41

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 01/13508

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 12, 15-24 und 38-41 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat
ktenzeichen
PCT/EP 01/13508

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0716605	B	19-06-1996	DE 4330773 A1	16-03-1995
			AT 174222 T	15-12-1998
			AU 679262 B2	26-06-1997
			AU 7695694 A	27-03-1995
			CA 2171197 A1	16-03-1995
			CZ 9600708 A3	16-10-1996
			DE 59407457 D1	21-01-1999
			DK 716605 T3	16-08-1999
			WO 9507084 A1	16-03-1995
			EP 0716605 A1	19-06-1996
			ES 2127940 T3	01-05-1999
			GR 3029619 T3	30-06-1999
			HU 74431 A2	30-12-1996
			JP 9502195 T	04-03-1997
			PL 313393 A1	24-06-1996
			SK 32996 A3	05-03-1997
			US 5683991 A	04-11-1997
DE 4223613	A	20-01-1994	DE 4223613 A1	20-01-1994
US 5834442	A	10-11-1998	AU 695677 B2	20-08-1998
			AU 2944295 A	09-02-1996
			BR 9508245 A	30-09-1997
			CA 2194586 A1	25-01-1996
			CN 1157567 A	20-08-1997
			EP 0768885 A1	23-04-1997
			FI 965269 A	07-03-1997
			JP 11503715 T	30-03-1999
			NO 970039 A	17-02-1997
			WO 9601640 A1	25-01-1996
			US 5895784 A	20-04-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)